



**PATENT APPLICATION**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of

Docket No: Q78575

Ken-ichiro NAKAMOTO, et al.

Appln. No.: 10/716,432

Group Art Unit: Unknown

Confirmation No.: 6967

Examiner: Unknown

Filed: November 20, 2003

For: MODIFIED BIO-RELATED SUBSTANCE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME,  
AND INTERMEDIATE

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to  
priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to  
acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,

Mark Boland  
Registration No. 32,197

SUGHRUE MION, PLLC  
Telephone: (202) 293-7060  
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

**23373**

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: Japan 2002-337113

Date: October 4, 2004

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 1 月 2 0 日  
Date of Application:

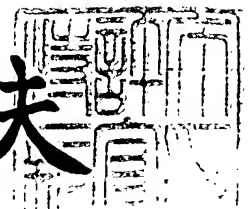
出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 3 7 1 1 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 3 7 1 1 3 ]

願        人            日 本 油 脂 株 式 会 社  
Applicant(s):

2 0 0 3 年 1 2 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

【書類名】 特許願

【整理番号】 31214111

【提出日】 平成14年11月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 47/00  
A61K 31/00  
C08G 65/00

【発明の名称】 修飾された生体関連物質、その製造方法および中間体

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市梶原 2 - 2 6 - 6 - 3 0 6

【氏名】 中本 憲一郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区藤崎 2 - 3 - 9

【氏名】 大橋 俊輔

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区荏原 6 - 8 - 4 - 1 0 2

【氏名】 山本 裕二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区藤崎 2 - 3 - 9

【氏名】 坂上 研二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区東古市場 1 0 3 - 2 0 3

【氏名】 伊藤 智佳

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東 1 - 1 - 3 - 4 0 1

【氏名】 安河内 徹

## 【特許出願人】

【識別番号】 000004341

【氏名又は名称】 日本油脂株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100097490

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 益稔

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100097504

【弁理士】

【氏名又は名称】 青木 純雄

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 082578

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

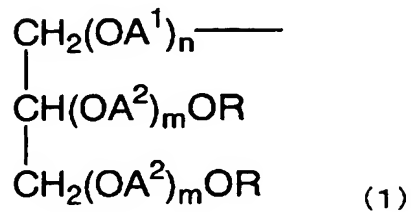
【書類名】 明細書

【発明の名称】 修飾された生体関連物質、その製造方法および中間体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分子中に少なくとも 1 個の下記式 (1) で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質。

【化 1】



(式中、R は炭素数 1 ～ 24 の炭化水素基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$  は炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、R、 $\text{OA}^2$  は一分子中で互いに同一または異なっており、n および m は前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、n は 0 ～ 1000 を示し、m は 10 ～ 1000 を示す。)

【請求項 2】 式 (1) において、R が炭素数 1 ～ 10 の炭化水素基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$  は炭素数 2 ～ 3 のオキシアルキレン基であり、n は 0 ～ 500 であり、m は 10 ～ 800 である、請求項 1 記載の修飾された生体関連物質。

【請求項 3】 式 (1) において、R がメチル基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$  がオキシエチレン基であり、n が 0 ～ 200 であり、m が 20 ～ 500 である、請求項 1 記載の修飾された生体関連物質。

【請求項 4】 式 (1) において、n が 0 である、請求項 3 記載の修飾された生体関連物質。

【請求項 5】 式 (1) において、n が 1 ～ 200 である、請求項 3 記載の修飾された生体関連物質。

【請求項 6】 前記生体関連物質が生体に対する生理活性を有することを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか一つの請求項に記載の修飾された生体関連物質。

【請求項 7】 前記生体関連物質がタンパク質またはポリペプチドである、請求項

1～6のいずれか一つの請求項に記載の修飾された生体関連物質。

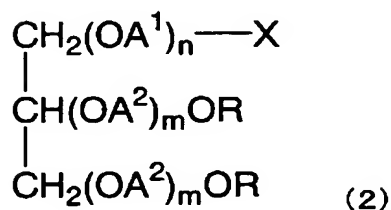
【請求項8】前記生体関連物質が抗癌剤である、請求項6記載の修飾された生体関連物質。

【請求項9】前記生体関連物質が抗真菌剤である、請求項6記載の修飾された生体関連物質。

【請求項10】前記生体関連物質がリン脂質である、請求項1～6のいずれか一つの請求項に記載の修飾された生体関連物質。

【請求項11】下記式(2)で示されることを特徴とする、修飾された生体関連物質の中間体。

【化2】



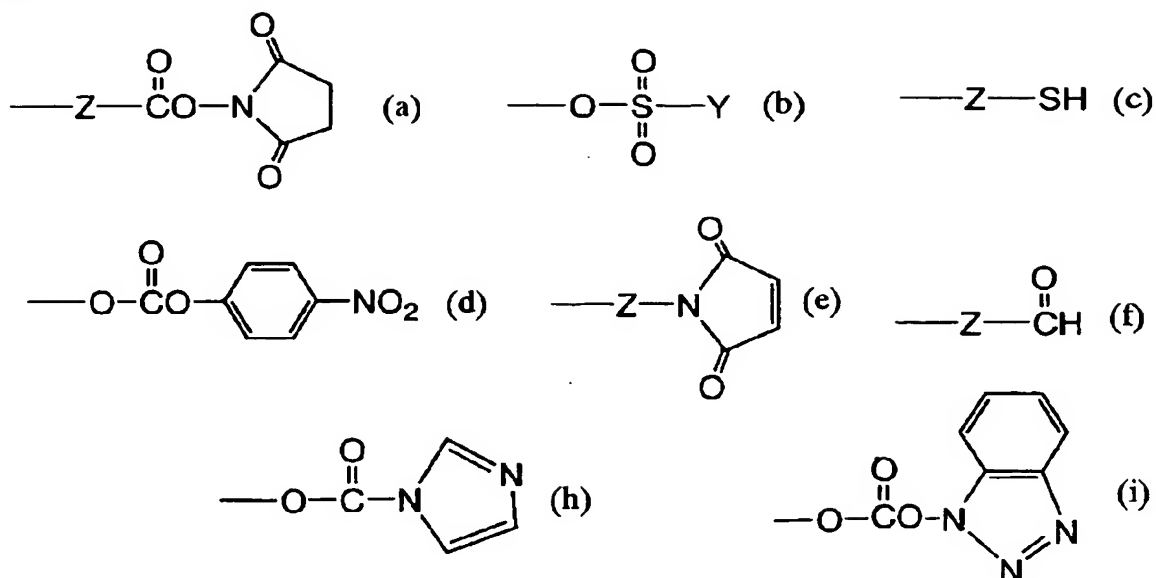
(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$ は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、 $\text{OA}^2$ は一分子中で互いに同一または異なり、nおよびmは前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示し、Xは、前記生体関連物質と化学反応可能な官能基を示す)

【請求項12】前記官能基が、前記生体関連物質のアミノ基、メルカプト基、不飽和結合またはカルボキシル基と反応可能な官能基であることを特徴とする、請求項11記載の中間体。

【請求項13】Xが群(I)より選択される基である、請求項12記載の中間体。

## 【化3】

## 群(I)

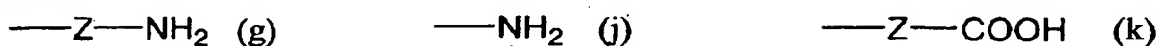


(群(I)中、Zはアルキレン基単独、もしくはエーテル結合、エステル結合、ウレタン結合、アミド結合、カーボネート結合、スルフィド結合、2級アミノ基を含むアルキレン基を示す。Yは炭素数1～10のフッ素原子を含んでも良い炭化水素基を示す。)

【請求項14】Xが群(II)より選択される基である、請求項12記載の中間体。

## 【化4】

## 群(II)



(群(II)中、Zはアルキレン基単独、もしくはエーテル結合、エステル結合、ウレタン結合、アミド結合、カーボネート結合、スルフィド結合、2級アミノ基を含むアルキレン基を示す。)

【請求項15】式(2)においてnが0である、請求項11～14のいずれか一

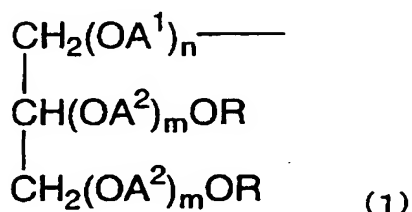
つの請求項に記載の中間体。

【請求項 16】式 (2) において  $n$  が 1 ～ 200 である、請求項 11 ～ 14 のいずれか一つの請求項に記載の中間体。

【請求項 17】分子中に少なくとも 1 個の下記式 (1) で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質を製造する方法であって、

生体関連物質に対して、請求項 11 ～ 16 のいずれか一つの請求項に記載の中間体を結合する工程を有することを特徴とする、修飾された生体関連物質の製造方法。

【化 5】



(式中、 $R$  は炭素数 1 ～ 24 の炭化水素基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$  は炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、 $R$ 、 $\text{OA}^2$  は一分子中で互いに同一または異なっており、 $n$  および  $m$  は前記オキシアルキレン基の平均付加モル数であり、 $n$  は 0 ～ 1000 を示し、 $m$  は 10 ～ 1000 を示す。)

【請求項 18】式 (1) において、 $R$  が炭素数 1 ～ 10 の炭化水素基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$  は炭素数 2 ～ 3 のオキシアルキレン基であり、 $n$  は 0 ～ 500 であり、 $m$  は 10 ～ 800 である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】式 (1) において、 $R$  がメチル基であり、 $\text{OA}^1$ 、 $\text{OA}^2$  がオキシエチレン基であり、 $n$  が 0 ～ 200 であり、 $m$  が 20 ～ 500 である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 20】前記生体関連物質が生体に対する生理活性を有することを特徴とする、請求項 17 ～ 19 のいずれか一つの請求項に記載の方法。

【請求項 21】前記生体関連物質がタンパク質またはポリペプチドである、請求項 17 ～ 20 のいずれか一つの請求項に記載の方法。



【請求項 22】 前記生体関連物質が抗癌剤である、請求項 20 記載の方法。

【請求項 23】 前記生体関連物質が抗真菌剤である、請求項 20 記載の方法。

【請求項 24】 前記生体関連物質がリン脂質である、請求項 17～20 のいずれか一つの請求項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ポリアルキレングリコール誘導体との結合によって修飾された生体関連物質、その製造方法、および中間体である反応性ポリアルキレングリコール誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、生理活性を有するタンパク質、ポリペプチド、合成化合物、及び天然資源より抽出された化合物等が数多く発見されており、それらの医薬品への応用が盛んに研究されている。しかし、これらの生理活性物質は、生体内に投与された際の血中半減期が短く、十分な薬理効果を得ることは難しい。これは、通常生体内へ投与された生理活性物質が、腎臓における糸球体濾過や、肝臓や脾臓などにおけるマクロファージの取り込みにより、生体内から消失するためである。このため、これらの生理活性物質をリポソームやポリマーミセル中へ封入したり、両親媒性高分子であるポリエチレングリコールを化学修飾させて分子量を増大させることで、生体内挙動を改善する試みがなされている。ポリエチレングリコールは、その立体反発効果のために他の生体成分との相互作用が低く、結果、ポリエチレングリコールで修飾したタンパク質や酵素等のポリペプチドは、生体内へ投与された場合、腎臓における糸球体濾過や免疫反応等の生体反応を回避させる効果があり、非修飾のものより長い血中半減期を達成する。また、毒性や抗原性も低下し、更には、疎水性の高い難水溶性の化合物の溶解性を高める効果もある。

【0003】 従来、生理活性物質をポリエチレングリコール修飾する場合、特に低分子薬剤やペプチドを修飾する場合、ポリエチレングリコール修飾に用いることができる反応性官能基が少ないという問題点があった。更には、十分なポリエチレングリコール修飾の効果を得るために、数多くのポリエチレングリコール

分子で修飾した場合、ペプチドや薬剤の活性点を封鎖してしまい、それ自身が持つ機能、薬効を十分に発現できなくなったり、十分な水への溶解性が得られなくなるという問題点があった。

このような問題点を解決するために、分岐型のポリエチレングリコール誘導体を用い、ポリエチレングリコールの修飾数を減らし、この問題点を解決しようとする試みがなされている。特許文献1には、ポリエチレングリコール化L-アスパラギナーゼが提案されている。しかしながら、反応性ポリエチレングリコール誘導体の原料である塩化シアヌルには3つの反応性部位があり、ここに2本のポリエチレングリコール鎖を選択的に導入することは困難であり、純度の高いポリエチレングリコール化L-アスパラギナーゼを合成するのは困難である。

#### 【特許文献1】

特公昭61-42558号公報

【0004】 また、特許文献2には、ポリエチレングリコール化インターフェロン $\alpha$ が提案されている。しかしながら、この物質はインターフェロン $\alpha$ とポリエチレングリコールオキシ基との結合部位も含めて、ウレタン結合やアミド結合が3個存在する。これらの結合は保存中、あるいはアルカリ性条件下での反応中に加水分解を受けやすく、結果、分岐型ポリエチレングリコール部分が一本鎖に分解してしまうという問題点があった。これは、中間原料のポリエチレングリコール誘導体が、2本のモノメトキシポリエチレングリコールとリジンの $\alpha$ 位および $\epsilon$ 位のアミノ基とウレタン結合にて結合させた後、リジンのカルボキシル残基をN-オキシコハク酸イミドエステルへ変換させる方法で製造されるためである。また、このポリエチレングリコール化インターフェロン $\alpha$ を製造するためには、2本のモノメトキシポリエチレングリコール末端水酸基の活性化、リジンとの結合、リジンのカルボキシル残基の活性化、インターフェロン $\alpha$ との結合等、多段階の工程数を経るため、不純物も多くなるという問題点もある。

#### 【特許文献2】

特開平10-67800号公報

【0005】 そのため、安定性の高い結合で形成された生体関連物質、その製造方法、及び、簡便かつ高純度に製造でき、より安定性が高い、分岐型の反応性

ポリアルキレングリコール誘導体が望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の第1の目的は、安定な結合によって形成され、一本鎖に分解しにくい、分岐型ポリアルキレングリコールオキシ基を有する生体関連物質とその製造方法を提供することである。

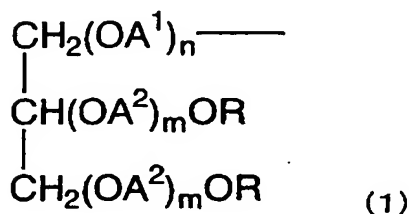
【0007】 本発明の第2の目的は、グリセリン骨格の1位の1級炭素に生体関連物質と結合可能な反応性基を、2位と3位にポリアルキレングリコール鎖を有し、生体関連物質との結合部位を除くすべての結合を安定性の高いエーテル結合で形成させるポリアルキレングリコール誘導体を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、新規な分岐型ポリアルキレングリコールオキシ基を有する生体関連物質、その製造方法、及びその中間体となるポリアルキレングリコール誘導体を見だし、本発明を完成した。

【0009】 即ち、本発明は、分子中に少なくとも1個の下記式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質に係るものである。

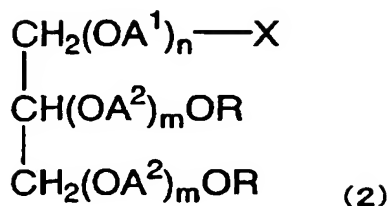
【化6】



(式中、Rは炭素数1～24の炭化水素基であり、OA<sup>1</sup>、OA<sup>2</sup>は炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、R、OA<sup>2</sup>は一分子中で互いに同一または異なっており、nおよびmはオキシアルキレン基の平均付加モル数であり、nは0～1000を示し、mは10～1000を示す。)

【0010】 また、本発明は、前記修飾された生体関連物質に対する中間体であり、下記式(2)で示されることを特徴とする中間体に係るものである。

## 【化 7】



(式中、R、OA<sup>1</sup>、OA<sup>2</sup>、n、mは上記と同じであり、Xは、生体関連物質と化学反応可能な官能基を示す)

【0011】 また、本発明は、分子中に少なくとも1個の下記式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質を製造する方法であって、

生体関連物質に対して前記中間体を結合する工程を有することを特徴とする。

【0012】 本発明の修飾された生体関連物質は、安定な結合によって形成され、一本鎖に分解しにくい。また、グリセリン骨格の1位の1級炭素に生体関連物質と結合可能な反応性基を、2位と3位にポリアルキレングリコール鎖を有し、生体関連物質との結合部位を除くすべての結合を安定性の高いエーテル結合で形成させるポリアルキレングリコール誘導体を提供できる。

## 【0013】

【発明の実施の形態】 本発明の修飾された生体関連物質は、少なくとも1個の前記式(1)で表されるポリアルキレングリコールオキシ基に対して、生体関連物質を結合させたものである。

式(1)のポリアルキレングリコールオキシ基におけるRは、炭素数1から24の炭化水素基であり、具体的な炭化水素基としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、2-エチルヘキシル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、オレイル基、ノナデシル基、エイコシル基、ヘンエイコシル基、ドコシル基、トリコシル基、テトラコシル基、ベンジル基、クレジル基、ブチルフェニル基、ドデシルフェニル

基等の炭化水素基が挙げられるが、好ましくはメチル基、エチル基の場合であり、更に好ましくはメチル基の場合である。

0A<sup>1</sup>、0A<sup>2</sup>は、炭素数2～4のオキシアルキレン基を示す。具体的には、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などが挙げられる。オキシアルキレン基は同一であっても異なってもよく、またはランダム状に付加していてもブロック状に付加していてもよい。一般に、アルキレン基の炭素数の少ない方がより親水性が高く、好ましくはオキシエチレン基、オキシプロピレン基であり、より好ましくはオキシエチレン基である。 $n$ および $m$ はオキシアルキレン基の平均付加モル数であり、 $m$ が10～1000であり、 $n$ が0～1000である。好ましくは、 $m$ が10～800であり、 $n$ が0～500の場合である。更に好ましくは、 $m$ が20～500であり、 $n$ が0～200の場合である。好適な実施形態においては $n$ が0である。他の好適な実施形態においては $n$ が1～200である。後者の場合には、 $n$ が1～50であることが特に好ましい。

生体関連物質へのポリアルキレングリコールオキシ基の修飾数は特に限定されないが、1～100箇所が好ましく、更に好ましくは1～20箇所である。

【0014】 本発明で言う「生体関連物質」とは、生体に関連する物質を意味する。生体に関連する物質とは、以下を含むものである。

(1) リン脂質、糖脂質、糖タンパク等の動物細胞構成材料

動物細胞構成材料とは、細胞膜等を構成する成分であり、特にその種類を限定されるものではないが、例えばリン脂質、糖脂質、糖タンパク質等が挙げられる。より具体的なリン脂質としては、例えばファスファチジン酸、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルイノシトールが挙げられる。また、これらのリゾ体も含まれる。これらリン脂質は卵黄あるいは大豆等の天然物由来のものでも良いし、合成物でも良い。脂肪酸組成としては、特に限定されるものではないが、好ましくは炭素数12～22の脂肪酸が挙げられる。これらの脂肪酸は飽和脂肪酸でも良いし、不飽和結合を含んだものでも

良い。より具体的な糖脂質としては、例えばセラミド、セレブロシド、スフィンゴシン、ガングリオシド、グリセロ糖脂質等が挙げられる。また、脂肪酸、モノグリセライド、ジグリセライド、コレステロール、胆汁酸もこれに含まれる。

【0015】 (2) 血液、リンパ液、骨髄液等の体液構成物質

体液構成物質とは、細胞内外に存在する液体成分であり、特にその種類を限定されるものではないが、血液、リンパ液、骨髄液が挙げられる。これら体液のより具体的な構成成分としては、例えばヘモグロビン、アルブミン、血液凝固因子等が挙げられる。

【0016】 (3) ビタミン、神経伝達物質、タンパク質、ポリペプチド、薬剤等の生理活性物質

生理活性物質とは、体の働きを調節する成分であり、特にその種類を限定されるものではないが、ビタミン、神経伝達物質、タンパク質、ポリペプチド、薬剤が挙げられる。

より具体的なビタミンとしては、例えばビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK等が挙げられる。

より具体的な神経伝達物質としては、例えばアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、アセチルコリン、GABA、グルタミン酸、アスパラギン酸等が挙げられる。

より具体的なタンパク質、ポリペプチドとしては、例えば以下に挙げられるものがある。脳下垂体ホルモン、甲状腺ホルモン、男性ホルモン、女性ホルモン、副腎皮質ホルモン等のホルモン。ヘモグロビン、血液因子等の血清タンパク質。IgG、IgE、IgM、IgA、IgD等の免疫グロブリン。インターロイキン (IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11およびIL12サブタイプ)、インターフェロン ( $-\alpha$ 、 $-\beta$ 、 $-\gamma$ )、顆粒球コロニー刺激因子 ( $\alpha$ および $\beta$ 型)、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子、血小板由来増殖因子、ホスホリパーゼ活性化タンパク質、インシュリン、グルカゴン、レクチン、リシン、腫瘍壊死因子、上皮細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子 ( $-\alpha$ 、 $-\beta$ )、繊維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、血管内皮増殖因子

、神経成長因子、骨増殖因子、インスリン様増殖因子、ヘパリン結合増殖因子、腫瘍増殖因子、グリア細胞株由来神経栄養因子、マクロファージ分化因子、分化誘導因子、白血病阻害因子、アンフィレグリン、ソマトメジン、エリスロポエチン、ヘモポエチン、トロンボポエチン、カルシトニン等のサイトカインおよびそのフラグメント。タンパク質分解酵素、オキシドリダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼ、アスパラギナーゼ、アルギナーゼ、アルギニンデアミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、エンドトキシナーゼ、カタラーゼ、キモトリプシン、リパーゼ、ウリカーゼ、エラスターゼ、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、アデノシンジホスファターゼ、チロシナーゼ、ビリルビンオキシターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコダーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコセレブリンダーゼ、グルコウロニダーゼ等の酵素。モノクローナル及びポリクローナル抗体およびそれらのフラグメント。ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン等のポリアミノ酸。B型肝炎ワクチン、マラリアワクチン、メラノーマワクチン、HIV-1 ワクチン等のワクチンおよび抗原。また、糖タンパクも含まれる。また、これらの生理活性物質と同様の生理活性を有する類似構造物質もこれに含まれる。

また、これらのタンパク質、ポリペプチドは、それらの天然源または遺伝子工学的処理を受けた細胞から単離されるか、あるいは種々の合成法を経て作り出されたものでも良い。

【0017】 薬剤としては、特に限定されるものではないが、より好ましくは抗癌剤と抗真菌剤が挙げられる。

より具体的な抗癌剤としては、特に限定されるものではないが、例えばパクリタキセル、アドリアマイシン、ドキソルビシン、シスプラチン、ダウノマイシン、マイトマイシン、ビンクリスチン、エピルビシン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、アクラシノマイシン、イダマイシン、ブレオマイシン、ピラルビシン、ペプロマイシン等が挙げられる。

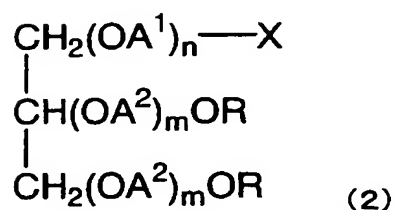
具体的な抗真菌剤としては、特に限定されるものではないが、例えばアムホテリシンB、ナイスタチン、フルシトシン、ミコナゾール、フルコナゾール、イト

ラコナゾール、ケトコナゾールおよびペプチド性抗真菌剤が挙げられる。

また、これら生理活性物質には、例えば抗酸化作用、PAF阻害作用、抗炎症作用、抗菌作用等を有する、フラボノイド、テルペノイド、カルテノイド、サポニン、ステロイド、キノン、アントラキノン、キサントン、クマリン、アルカロイド、ポルフィリン、ポリフェノール等も含まれる。

【0018】 本発明の生体関連物質の中間体は、下記式(2)で示される。

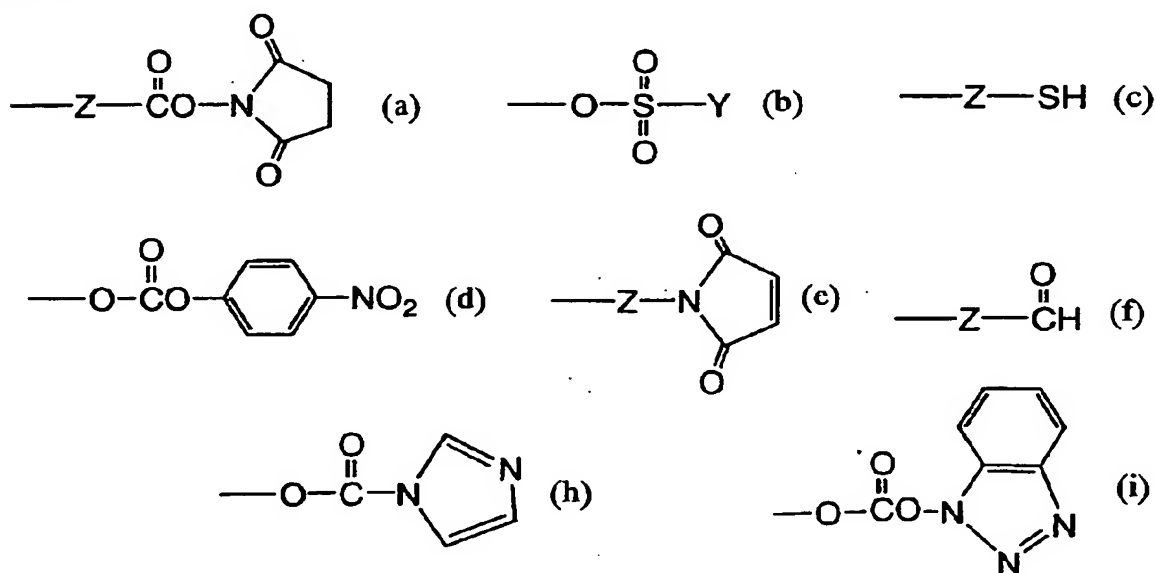
【化8】



【0019】 式中、Xは、生体関連物質と化学結合を生成し得る官能基または不飽和結合であれば特に制限されない。好適な実施形態においては、Xは、群(I)、群(II)で示される基である。

【化9】

群(I)





## 【化10】

## 群(II)

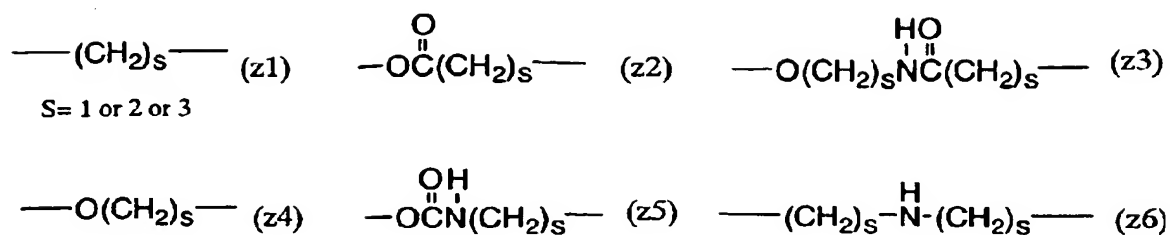


【0020】 生体関連物質のアミノ基と反応させる場合は、(a)、(b)、(d)、(f)、(h)、(i)、(k)で示される基が好ましく、生体関連物質のメルカプト基と反応させる場合は、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)、(i)、(k)で示される基が好ましく、生体関連物質の不飽和結合と反応させる場合は、(c)で示される基が好ましく、生体関連物質のカルボキシル基と反応させる場合は(c)、(g)、(j)で示される基が好ましい。

【0021】 群(I)、群(II)におけるZは、ポリアルキレングリコールオキシ基と反応性官能基との間のリンカーであり、共有結合であれば特に制限は無いが、好ましくはアルキレン基、及びエステル結合、ウレタン結合、アミド結合、エーテル結合、ウレア結合、カーボネート結合、スルフィド結合、2級アミノ基を含んだアルキレン基等が挙げられる。アルキレン基として好ましいものは、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、イソプロピレン基、イソブチレン基等が挙げられ、更に好ましくは下記(z1)のような構造が挙げられる。エステル結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z2)のような構造が挙げられる。アミド結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z3)のような構造が挙げられる。エーテル結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z4)のような構造が挙げられる。ウレタン結合を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z5)のような構造が挙げられる。2級アミノ基を含んだアルキレン基として更に好ましいものは、下記(z6)のような構造が挙げられる。各式において、sは1～3の整数である。

## 【0022】

## 【化 11】



Yは炭素数1～10のフッ素原子を含んでも良い炭化水素基であり、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、第三ブチル基、ヘキシル基、ノニル基、ビニル基、フェニル基、ベンジル基、4-メチルフェニル基、トリフルオロメチル基、2, 2, 2-トリフルオロエチル基、4-(トリフルオロメトキシ)フェニル基等が挙げられるが、好ましくはメチル基、ビニル基、4-メチルフェニル基、2, 2, 2-トリフルオロエチル基の場合である。

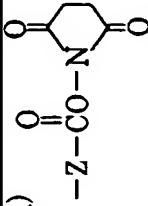
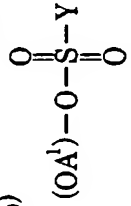
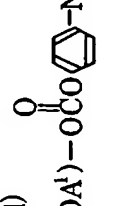
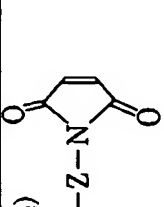
式(2)で表される化合物において、R、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O、n、mは前述と同じである。

群(II)におけるZ、R、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O、n、mも前述と同じである。

【0023】 以下、前記した生体関連物質の残基Tと、この残基Tと化学結合を生成するポリアルキレングリコールオキシ基側の官能基Xとの関係を、表1、表2に示す。また、生体関連物質とXとの反応によって生成する、ポリアルキレングリコールオキシ基鎖と生体関連物質との化学結合の種類をも表1、表2に示す。

## 【0024】


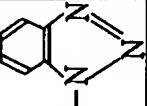
【表 1】

生理活性物質 の反応基 X 基	NH <sub>2</sub> -T アミノ基	SH-T メルカプト基	$\text{>=T}$ 不飽和結合	$\text{HO-C(=O)-T}$ カルボキシル基
(a) 	$\text{H}$ $\text{O=C-N-T}$ (アミド)	$\text{O=C-S-T}$ (チオエステル)	$\text{>=}$	$\text{>=}$
(b) 	$\text{H}$ $\text{O=C-N-T}$ (二級アミノ基)	$\text{(OA')-S-T}$ (スルフィド)	$\text{>=}$	$\text{>=}$
(c) $\text{-Z-SH}$	$\text{>=}$	$\text{-Z-S-S-T}$ (ジスルフィド)	$\text{-Z-S-CH}_2\text{-T}$ (スルフィド)	$\text{-Z-SC(=O)-T}$ (チオエステル)
(d) 	$\text{O=C-N-T}$ (ウレタン)	$\text{(OA')-O-C(=O)-S-T}$ (チオカーボネート)	$\text{>=}$	$\text{>=}$
(e) 	$\text{>=}$	$\text{-Z-N-C(=O)-CH}_2\text{-C(=O)-S-T}$ (スルフィド)	$\text{>=}$	$\text{>=}$

注 (b),(d)は(OA')を除く部分を X 基とする

【0025】

【表 2】

生理活性物質 の反応基 X 基	NH <sub>2</sub> -T アミノ基	SH-T メルカプト基	$\text{>C=}$ 不飽和結合	$\text{HO-C(=O)-T}$ カルボキシル基
(f) $\text{O=CH}$ -Z-CH	$\text{H}$ $\text{-Z-C=N-T}$ 還元 (ジツア塩基) $\text{-Z-CH}_2\text{-N-T}$ (二級アミノ基)	$\text{OH}$ $\text{-Z-C-S-T}$ (スルフィド)	$\text{>C=}$	$\text{O=}$ $\text{HO-C-T}$ カルボキシル基
(h)  $\text{(OA')-OC-N}$	$\text{OH}$ $\text{(OA')-OCN-T}$ (ウレタン)	$\text{O=}$ $\text{(OA')-OCS-T}$ (チオカーボネート)	$\text{>C=}$	$\text{O=}$ $\text{HO-C-T}$ カルボキシル基
(i)  $\text{(OA')-OCO-N}$	$\text{OH}$ $\text{(OA')-OCN-T}$ (ウレタン)	$\text{O=}$ $\text{(OA')-OCS-T}$ (チオカーボネート)	$\text{>C=}$	$\text{O=}$ $\text{HO-C-T}$ カルボキシル基
(g),(j) -Z-NH <sub>2</sub>	$\text{O=}$ $\text{-Z-C-N-T}$ (アミド)	$\text{O=}$ $\text{-Z-C-S-T}$ (チオエステル)	$\text{>C=}$	$\text{O=}$ $\text{H-N-C-T}$ (アミド)
(k) -Z-COOH	$\text{O=}$ $\text{-Z-C-N-T}$ (アミド)	$\text{O=}$ $\text{-Z-C-S-T}$ (チオエステル)	$\text{>C=}$	$\text{O=}$ $\text{H-N-C-T}$ (アミド)

注 (h),(i)は(OA')を除く部分を X 基とする

【0026】 表から明らかなように、本発明の修飾された生体関連物質においては、ポリアルキレングリコールオキシ鎖と生体関連物質とは、例えばアミド結合、二級アミノ基、ウレタン結合、チオエステル結合、スルフィド結合、ジスルフィド結合、チオカーボネート結合によって結合されている。

【0027】 本発明の修飾された生体関連物質は、以下のようにして製造することができる。

(生体関連物質のアミノ基と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質のアミノ基を用いて修飾する場合、本発明の中間体(a), (b), (d), (f), (h), (i), (k) を用いる。反応の際には、生体関連物質に対し、本発明の中間体(a), (b), (d), (f), (h), (i), (k)を等モル以上の使用割合にて反応させればよい。反応溶媒としては、反応に関与しない溶媒であれば特に限定されないが、タンパク質、ポリペプチドを反応させる場合は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス酸緩衝液、酢酸緩衝液などの緩衝液が好ましい溶媒として挙げられる。更には、タンパク質、ポリペプチドの活性を失うことなく、反応に関与しないアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等の有機溶媒を添加しても良い。抗癌剤、抗真菌剤、リン脂質を反応させる場合は、前述の緩衝液のほかにもトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、*t*-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、水、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、2-プロパノール、*n*-ブタノール等が好ましい溶媒として挙げられる。また、溶媒を用いなくとも良い。本発明の中間体と生体関連物質を反応溶媒に加える順番はどちらが先でも良い。反応温度は、生体関連物質の活性が失われない温度であれば特に限定されないが、タンパク質、ポリペプチドを反応させる場合は、好ましくは0～40℃であり、抗癌剤、抗真菌剤、リン脂質を反応させる場合は、好ましくは-20～150℃である。反応時間は0.5～72時間が好ましく、更に好ましくは、1～24時間である。反応に際しては、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)等の縮合剤を用いても良い。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間に共有結合が形成されるが、(a)、(k)を用いた場合はアミド結合、(b)を用いた場合は2級アミノ基、(d)、(h)、(i)を用いた場合はウレタン結合、(f)を用いた場合はシッフ塩基形成される。シッフ塩基が形成される場合は、これをシアノ水素化ホウ酸ナ

トリウム等の還元剤を用いて還元処理を行い、2級アミノ基を形成させても良い。反応後は、透析、塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等の精製手段にて精製してもよい。

【0028】 (生体関連物質のメルカプト基と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質のメルカプト基を用いて修飾する場合、本発明の中間体(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)、(i)、(k)を用いるが、より好ましくは、(e)を用いる。反応溶媒、反応条件等は、アミノ基を用いる場合と同じである。反応に際しては、ヨウ素やAIBNの様なラジカル発生剤を用いてもよい。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間に共有結合が形成されるが、(a)、(k)を用いる場合はチオエステル結合が、(d)、(h)、(i)を用いた場合はチオカーボネート結合が、(c)を用いた場合はジスルフィド結合が、(b)、(e)、(f)を用いた場合はスルフィド結合が形成される。

【0029】 (生体関連物質の不飽和結合と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質の不飽和結合を用いて修飾する場合、本発明の中間体(c)を用いる。反応溶媒、反応条件等は、アミノ基を用いる場合と同じである。反応に際しては、ヨウ素やAIBNの様なラジカル発生剤を用いてもよい。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間にスルフィド結合が形成される。

【0030】 (生体関連物質のカルボキシル基と本発明の中間体を反応させる場合)

生体関連物質のカルボキシル基を用いて修飾する場合、本発明の中間体(c)、(g)、(j)を用いる。反応溶媒、反応条件等は、アミノ基を用いる場合と同じである。反応に際しては、適宜DCC、EDC等の縮合剤を用いても良い。この反応を行うことで、生体関連物質と本発明の中間体との間に共有結合が形成されるが、(c)を用いる場合はチオエステル結合が、(g)、(j)を用いる場合はアミド結合が形成される。

また、生体関連物質にアミノ基、メルカプト基、不飽和結合、カルボキシル基

が無い場合も、適宜生体関連物質に反応性基を導入し、本発明の中間体を用いて修飾させることができる。

【0031】 (中間体の製造)

本発明の中間体は、例えば次のようにして製造することができる。2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの1級水酸基残基へ、アルキレンオキシドを0~1000モル重合させ、末端水酸基をベンジル基やt-Bu基で保護した後、酸性条件にて環状アセタール構造を脱保護し、新たに生成した2個の水酸基へアルキレンオキシドを10~1000モル重合させ、末端をアルキルエーテル化する。次いで、ベンジル基やt-Bu基等の保護基を脱保護し、下記一般式(p)の化合物を得ることが出来る。

【0032】 また、化合物(p)は次のような方法でも製造することができる。2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの1級水酸基をベンジル基やt-Bu基で保護した後、酸性条件にて環状アセタール構造を脱保護し、新たに生成した2個の水酸基へアルキレンオキシドを10~1000モル重合させ、末端をアルキルエーテル化する。次いで、ベンジル基やt-Bu基等の保護基を脱保護し、新たに生成した水酸基へアルキレンオキシドを0~1000モル重合させても得ることができる。

【0033】 この様に、アルキレンオキシド付加重合反応を用いることで、高収率で、かつカラム精製することなく、工業的に適した方法で、一本鎖の不純物等を含むことのない高純度の分岐型ポリアルキレングリコール誘導体を製造することができる。

【0034】 このようにして得られた化合物(p)の水酸基を用いて、群(I)、群(II)に示した各種反応性基へ変性させることで本発明の中間体を製造することが出来る。更には、生成した反応性基を用いて、各種生体関連物質を反応、修飾させ、本発明の修飾された生体関連物質を製造することができる。

また、群(I)、群(II)の各官能基を有する中間体は、生体関連物質と反応させることができるが、場合によってはこれらの中間体を更に他の化合物と反応させて他の中間体を製造し、この他の中間体を生体関連物質と反応させることができる。例えば、群(II)に属する(g)(j)(k)の官能基を有する中

間体を原料とし、群 (I) の (a) (e) (f) の中間体を合成することができる。

【0035】 2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキソラン-4-メタノールの1級水酸基残基へのアルキレンオキシド付加重合は、トルエンもしくは無溶媒中、金属ナトリウムや金属カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム-*t*-ブトキシド等を用いて、公知の方法にて製造することができる。続くベンジルエーテル化は、非プロトン性溶媒もしくは無溶媒中、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ触媒存在下、ベンジルクロリドを反応させて得ることができる。また、末端水酸基を金属ナトリウム、金属カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム-*t*-ブトキシド等を用いてアルコラート化させ、塩基性条件下、ベンジルクロリドと反応させる方法でも良いし、末端水酸基をメタンスルホン酸クロリドや *p*-トルエンスルホン酸クロリド、2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホン酸クロリド等で活性化させ、前述と同様に調製したベンジルアルコールのアルコラートと反応させる方法でも良い。続く環状アセタール構造の脱保護は、酢酸、リン酸、硫酸、塩酸等の酸にて pH1 ~ 4 に調整した水溶液中で反応させ、製造することができる。

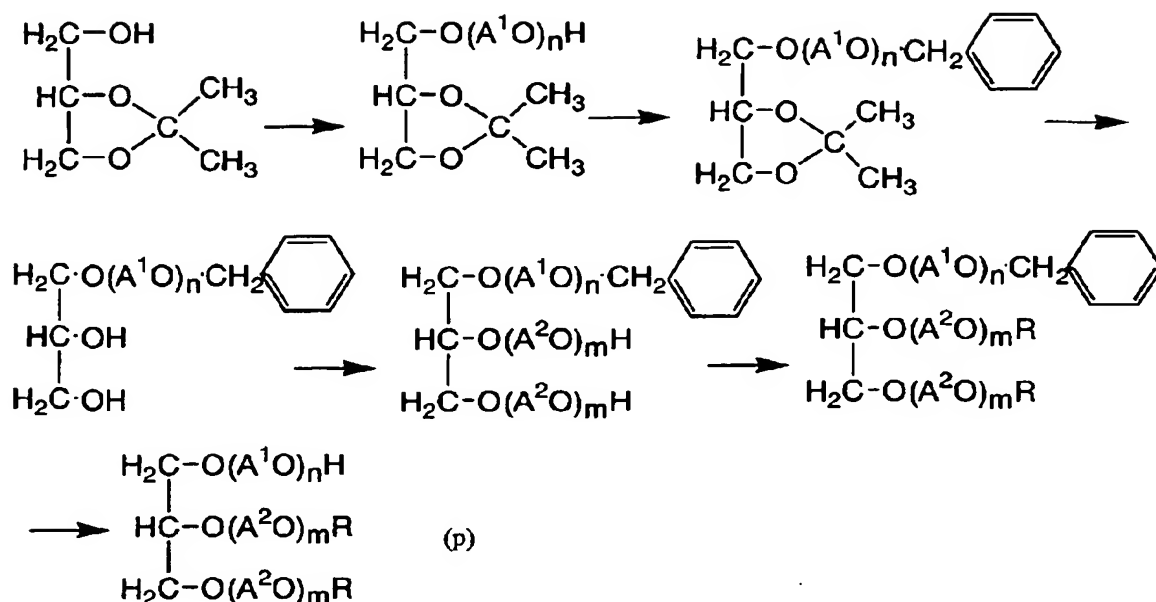
【0036】 環状アセタール構造の脱保護により新たに生成した2個の水酸基へのアルキレンオキシド付加重合は、前述のように公知の方法で製造することができる。続く末端のアルキルエーテル化は、前述の方法でポリアルキレングリコール鎖末端をアルコラート化させ、ハロゲン化アルキルと反応させる方法でも良いし、ポリアルキレングリコール鎖末端水酸基をメタンスルホン酸クロリドや *p*-トルエンスルホン酸クロリド、2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホン酸クロリド等で活性化させ、アルキルアルコールのアルコラートと反応させる方法でも良い。

脱ベンジル化は、パラジウムカーボン触媒、水素もしくは水素供与体を用い、公知の水添反応にて製造することができる。

【0037】

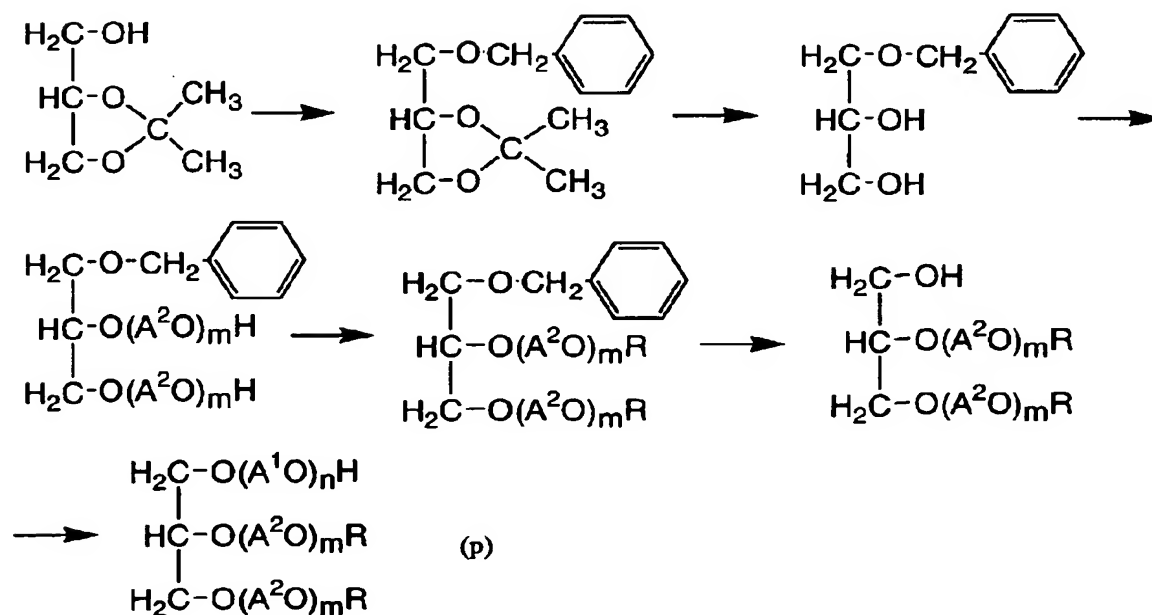


【化12】



【0038】

【化13】



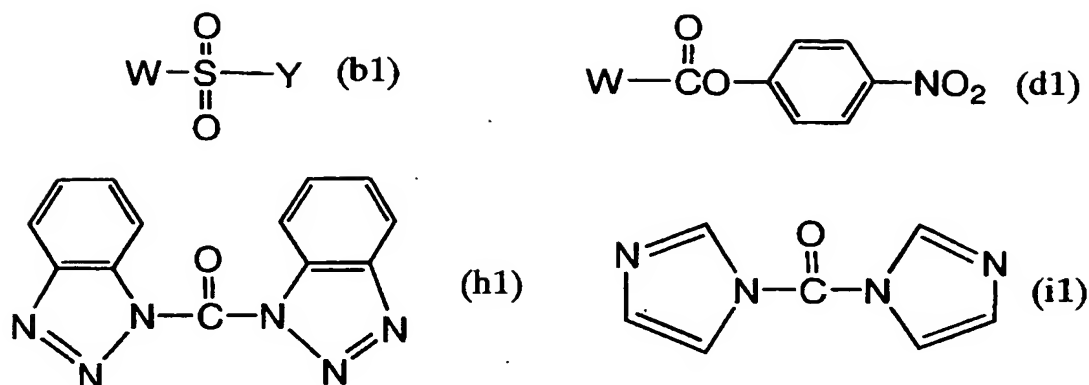
【0039】 続いて、脱ベンジル化反応により生成した化合物(p)の水酸基への反応性基の導入について説明する。

((b)、(d)、(h)、(i) の製造方法)

化合物 (p) とトルエン、ベンゼン、キシレン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、t-ブチルメチルエーテル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、トリエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン等の有機塩基、もしくは炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム等の無機塩基と下記一般式(b1)、(d1)、(h1)、(i1)で示される化合物のいずれかと反応させることで、それぞれ(b)、(d)、(h)、(i)を導入することができる。また、上記有機塩基、無機塩基は用いなくとも良い。有機塩基、無機塩基の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましい。また、有機塩基を溶媒として用いてもよい。(b1)、(d1)におけるWはCl、Br、Iより選択されるハロゲン原子であり、好ましくはClである。一般式(b1)、(d1)、(h1)、(i1)で示される化合物の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モルから50モルの範囲で反応させるのが好ましい。反応温度としては、0℃～300℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。生成した化合物は、抽出、再結晶、吸着処理、再沈殿、カラムクロマトグラフィー、超臨界抽出等の精製手段にて精製してもよい。

【0040】

## 【化14】



(WはCl、Br、Iより選択されるハロゲン原子)

## 【0041】 ((a)、(k)の製造方法)

化合物(p)を無水コハク酸や無水グルタル酸等のジカルボン酸無水物と反応させてカルボキシル体(k)を得た後、DCC、EDC等の縮合剤存在下、N-ヒドロキシコハク酸イミドと縮合反応させることで、(a)のコハク酸イミド体を得ることができる。化合物(p)とジカルボン酸無水物との反応は、上述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中で行う。ジカルボン酸無水物の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0℃～200℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。反応にはトリエチルアミン、ピリジン、ジメチルアミノピリジン等の有機塩基や炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム等の無機塩基を触媒として用いてもよい。触媒の使用割合は0.1重量%～50重量%が好ましく、さらに好ましくは0.5重量%～20重量%である。このようにして生成したカルボキシル体(k)は、前述の精製手段にて精製してもよいし、そのまま次の縮合反応に用いても良い。

【0042】 続く縮合反応も同様に上記非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中で行う。縮合剤としては、特に制限は無いが、好ましくはDCCである。DCCの使用割合は化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モ

ル～5モルである。N-ヒドロキシコハク酸イミドの使用割合は化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0℃～100℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～80℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0043】 ((g)、(j)の製造方法)

化合物(p)を水、アセトニトリル等の溶媒中、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の無機塩基を触媒とし、アクリロニトリル等を付加させてニトリル体を得たあと、オートクレーブ中でニッケルやパラジウム触媒下でニトリル基の水添反応を行うことで(g)のアミン体を得ることができる。ニトリル体を得る際の無機塩基の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して0.01wt%～50wt%が好ましい。アクリロニトリル等の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モルから100モルの範囲で反応させるのが好ましい。また、アクリロニトリルを溶媒として用いても良い。反応温度としては、-50℃～100℃が好ましく、更に好ましくは、-20℃～60℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。続くニトリル体の水添反応における反応溶媒は、反応に関与しない溶媒であれば特に制限は無いが、好ましくはトルエンである。ニッケル、もしくはパラジウム触媒の使用割合は、特に制限は無いが、ニトリル体に対して0.05wt%～30wt%であり、好ましくは0.5%～5%である。反応温度は20℃～200℃が好ましく、更に好ましくは、50℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。水素圧は2MPa～10MPaが好ましく、更に好ましくは3MPa～6MPaである。また、2量化を防ぐために反応系中にアンモニアを加えてもよい。アンモニアを加える場合の使用割合は、特に制限は無いが、好ましくはニトリル体に対して1wt%～100wt%であり、更に好ましくは5wt%～50wt%である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0044】 上記アミン体(g)、(j)は、(b)をアンモニア水で加水分解させることでも得ることができる。反応は、アンモニア水中で行い、アンモニアの濃

度は特に制限は無いが、好ましくは10%～40%の範囲である。アンモニア水の使用割合は、含有アンモニアが(b1)の等モル以上であれば特に制限は無いが、好ましくは、等モル～50000倍モルである。反応温度としては、0℃～100℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～80℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0045】 ((e)の製造方法)

更に、得られた(g)のアミンを、前述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中、無水マレイン酸と反応させてマレアミド体を得たあと、無水酢酸及び酢酸ナトリウムを触媒として、閉環反応させることで(e)のマレイミド体を得ることができる。マレアミド化反応における無水マレイン酸の使用割合は、特に制限はないが、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0℃～200℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～120℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成したマレアミド体は、前述の精製手段にて精製してもよいし、そのまま次の閉環反応に用いても良い。

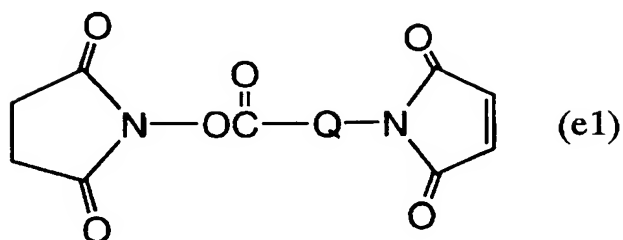
【0046】 続く閉環反応における反応溶媒は特に限定されないが、非プロトン性溶媒または無水酢酸が好ましい。酢酸ナトリウムの使用割合は、特に制限はないが、マレアミド体に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～50モルである。反応温度としては、0℃～200℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0047】 上記マレイミド体は、下記一般式(e1)と、上述の(g)、(j)のアミンを反応させることでも得ることができる。反応は、前述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中で行い、化合物(e1)を(g)、(j)のアミンに対して等モル以上加えて反応させる。(e1)の使用割合は(g)、(j)の等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～5モルである。反応温度としては、0℃～200℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～80℃である。反応時間は10分～48時間が好

ましく、更に好ましくは30分～12時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0048】

【化15】



(Qは炭素数1～7の炭化水素基を示す。)

【0049】 ((f)の製造方法)

化合物(b)を(f1)のアセタール化合物と反応させてアセタール体を得た後、酸性条件にて加水分解を行うことで、アルデヒド体(f)を得ることができる。化合物(b)の製造は上述の通りである。アセタール化反応は前述の非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中、(b)と等モル以上、好ましくは等モル～50モルの(f1)を反応させることで得ることができる。(f1)は相当するアルコールから、金属ナトリウム、金属カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム-*t*-ブトキシド等を用いて調製することができる。反応温度としては、0℃～300℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。

(f2)を用いる場合は、化合物(p)の水酸基を上述の方法でアルコラートとした後、前述の非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中、(f2)を等モル以上、好ましくは等モル～100モルの割合で反応を行うことでアセタール体を得ることができる。反応温度としては、0℃～300℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。

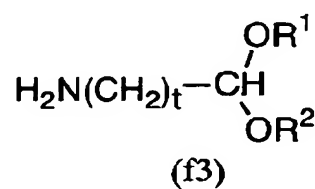
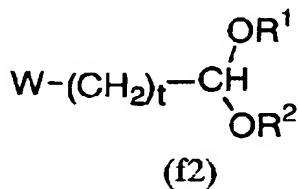
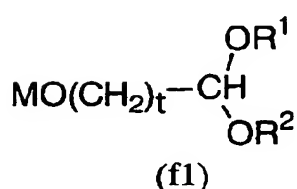
(f3)を用いる場合は、(a)、(b)、(d)、(h)、(i)もしくは(k) と(f3)を反応さ

せることでアセタール体を得ることができる。(a), (b), (d), (h)、(i)もしくは(k)の製造については前述の通りである。(f3)との反応では、溶媒は特に制限されないが、好ましくは前述の非プロトン性溶媒中で行う。(a), (b), (d), (h)、(i)もしくは(k)に対する(f3)の仕込み割合は、等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モル～10モルである。反応温度としては、 $-30^{\circ}\text{C}$ ～ $200^{\circ}\text{C}$ が好ましく、更に好ましくは、 $0^{\circ}\text{C}$ ～ $150^{\circ}\text{C}$ である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。(k)を用いる場合は、適宜DCC、EDC等の縮合剤を用いても良い。このようにして得られたアセタール体は前述の精製手段にて精製してもよいし、精製を行わずにそのまま次のアルデヒド化反応に用いても良い。

アルデヒド化は、アセタール体を酢酸、リン酸、硫酸、塩酸等の酸にてpH1～4に調整した水溶液中で加水分解させ、製造することができる。反応温度としては、 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $100^{\circ}\text{C}$ が好ましく、更に好ましくは、 $0^{\circ}\text{C}$ ～ $80^{\circ}\text{C}$ である。反応時間は10分～24時間が好ましく、更に好ましくは30分～10時間である。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0050】

【化16】



(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ は炭素数1～3の炭化水素基であり、それぞれ同一であっても、異なっても良い。また相互に環を形成していても良い。Mはナトリウムもしくはカリウムであり、WはCl、Br、Iより選択されるハロゲン原子であり、 $t$ は1～5の整数である。)

【0051】 ((c)の製造方法)

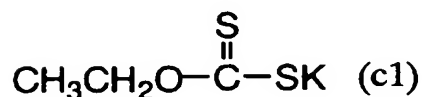
(c)のメルカプト体は、化合物(b)とチオウレア等のチア化剤と反応させ

ることと得ることができる。化合物(b)の製造は前述の通りである。チア化反応は水、アルコール、アセトニトリル等の溶媒中もしくは無溶媒中で行う。チオウレアの使用割合は、化合物(b)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モルから50モルの範囲である。反応温度としては、0℃～300℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～150℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。反応後、生成したチアゾリウム塩をアルカリ加水分解し、メルカプト体を得ることができる。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

また、上記メルカプト体は、化合物(b)を下記化合物(c1)と反応させ、1級アミンにて分解させることでも得ることができる。(b)と(c1)との反応は、前述の非プロトン性溶媒中、もしくは無溶媒中で行う。(c1)の使用割合は、化合物(p)に対して等モル以上が好ましく、更に好ましくは等モルから50モルの範囲である。反応温度としては、0℃～300℃が好ましく、更に好ましくは、20℃～80℃である。反応時間は10分～48時間が好ましく、更に好ましくは30分～24時間である。続く1級アミンによるアルカリ分解は、前述の非プロトン性溶媒、もしくは無溶媒中で行う。用いる1級アミンとしては特に制限は無いが、好ましくはアンモニア、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、ブチルアミン、ペンチルアミン、ヘキシルアミン、シクロヘキシルアミン、エタノールアミン、プロパノールアミン、ブタノールアミン等が挙げられる。当然、これらの1級アミンを溶媒として用いても良い。生成した化合物は前述の精製手段にて精製してもよい。

【0052】

【化17】



【0053】

【発明の効果】 本発明によれば、分岐型のポリアルキレングリコールオキシ基



によって修飾された生体関連物質を得ることができる。この生体関連物質は、ポリアルキレングリコールオキシ基とのリンカー部分を除き、すべてエーテル結合で形成されるため、1本鎖に分解することなく、高い安定性が期待される。このため、分岐型のポリアルキレングリコールを、生体関連物質に修飾することで、生体内挙動が改善された生体関連物質を提供することができる。本発明の生体関連物質の中間体は、グリセリン骨格の1位の1級炭素に生体関連物質と結合可能な反応性基を有し、2位と3位にポリアルキレングリコール鎖を有する新規化合物である。

#### 【0054】

【実施例】 以下、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明する。なお、例中の化合物の分析、同定には $^1\text{H}$ -NMRおよびGPCを用いた。

< $^1\text{H}$ -NMRの分析方法>  $^1\text{H}$ -NMR分析では、日本電子データム（株）製JNM-ECP400を用いた。

<GPCの分析方法> GPC分析では、SHODEX GPC SYSTEM-11を用い、下記条件にて測定を行った。

展開溶媒：テトラヒドロフラン                      流速：1 ml/min                      カラム

ム：SHODEX KF-801, KF-803, KF-804 (I.D. 8mm X 30cm)                      カラム温度

: 40℃                      検出器：RI X 8                      サンプル量：1mg/g, 100ul、

M<sub>n</sub>は数平均分子量、M<sub>w</sub>は重量平均分子量、M<sub>p</sub>はピークトップ分子量を表す。

【0055】 (実施例1) 化合物(p)の合成(R=メチル基、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O=オキシエチレン基、n=0、分子量約10000の場合)

(実施例1-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機を付した1000 ml 丸底フラスコへ2, 2-ジメチルー1, 3-ジオキソラン-4-メタノール132.2 g (1.0mol)、ナトリウムメトキシド28%メタノール溶液231.4 g (1.2mol)、トルエン500 mlを加え、窒素を吹き込みながらトルエンを1時間減圧還流させ、メタノールを留去した。この溶液を80℃保ちながら、ベンジルクロリド126.6 g (1.0mol)を滴下漏斗を用いて、2時間かけて滴下させ、更に2時間反応させた。反

応液を脱溶媒、蒸留精製(b.p. 93-95°C/266 Pa)し、4-(ベンジルオキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソランを得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 1.36, 1.42 (3H, 3H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 3.45-3.57 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 3.73-3.76 (1H, m,  $\text{CHO}-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) 4.03-4.07, 4.28-4.32 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 4.57 (2H, q,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 7.15-7.40 (5H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) (Phはフェニル基を示す)

(実施例 1-2)

1Lビーカーに、1-1で精製した4-(ベンジルオキシメチル)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン 222 g (1.0mol)、エタノール 250 ml、蒸留水 400 mlを計りとり、リン酸でpHを2に調整した。窒素を吹き込みながら、溶液を70°Cに加熱し、1.5時間反応後、水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、吸着剤「キョーワード1000」(協和化学工業株式会社製)にて塩を吸着処理し、脱溶剤を行い、3-ベンジルオキシ-1,2-プロパンジオールを得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.50-3.71 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 3.86-3.91 (1H, m,  $\text{CHOH}$ ) 4.54 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 7.27-7.38 (5H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ )

(実施例 1-3)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機を付した300 ml丸底フラスコへ3-ベンジルオキシ-1,2-プロパンジオール 27.3 g (0.15mol)、脱水トルエン 127 g、金属ナトリウム 0.9 g (39mmol)を加え、窒素を吹き込みながら金属ナトリウムが溶解するまで室温で攪拌した。この溶液を5Lオートクレーブへ仕込み、系内を窒素置換後、100°Cに昇温し、100~150°C、1MPa以下の圧力でエチレンオキシド 1473 g (33.5mol)を加えた後、更に1時間反応を続けた。減圧にて未反応のエチレンオキシドガスを除去後、60°Cに冷却して85%リン酸水溶液にてpHを7.5に調整し、下記化合物(p1)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.40-3.80 (899H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ) 4.54 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 7.27-7.38 (5H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ )

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 9978

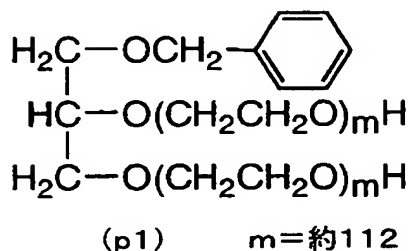
重量平均分子量(Mw): 10171

多分散度(Mw/Mn): 1.023

ピークトップ分子量(Mp): 10044

【0056】

【化18】



【0057】 (実施例1-4)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した500 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p1)を100 g (10mmol)、トルエン320 gを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン10.12 g (100mmol)、メタンスルホン酸クロリド6.87 g (60mmol)を加え、40℃にて6時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液を温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した500 ml 丸底フラスコへ移し、ナトリウムメトキシド28%メタノール溶液19.3 g (100mmol)を加え、70℃で6時間反応させた。続いて反応液へ吸着剤「キョーワード700」(協和化学工業株式会社製)を27 g加え、更に70℃で1時間攪拌し、過剰のナトリウムメトキシドを吸着処理させた。反応液をろ過後、濾液を1Lビーカーへ仕込み、酢酸エチル300 g、ヘキサン350 gを加えて晶析を行った。析出した結晶を1Lビーカーへ濾取し、酢酸エチル400 gを加えて40℃にて加温溶解後、ヘキサン300 gを加えて再度晶析を行い、析出した結晶を濾取、乾燥し、下記化合物(p2)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ )  
 3.40-3.80(899H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ) 4.54(2H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) 7.27-7.38(5H, m,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ )

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 10320

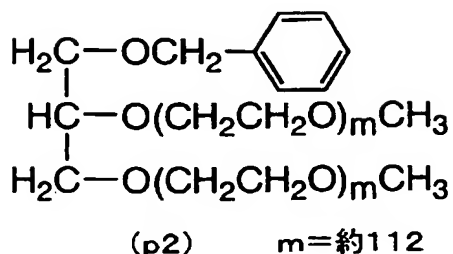
重量平均分子量(Mw): 10551

多分散度 (Mw/Mn) : 1.030

ピークトップ分子量 (Mp) : 10390

【0058】

【化19】



【0059】 (実施例1-5)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、及び冷却管を付した500ml丸底フラスコへ上記化合物(p2)を15g、5%パラジウムカーボン(50%含水品)15gを仕込み、窒素置換後、メタノール300ml、シクロヘキセン150mlを加えて昇温し、52~55℃で緩やかに還流させ、5時間反応させた。反応液を室温まで冷却後、パラジウムカーボンを濾別し、濾液を濃縮した。濃縮液に酢酸エチル50ml、ヘキサン50mlを加えて晶析させた。得られた結晶を濾取、乾燥し、下記化合物(p3)を得た。

 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)       $\delta$  (ppm): 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ )

 3.40-3.80(899H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ )

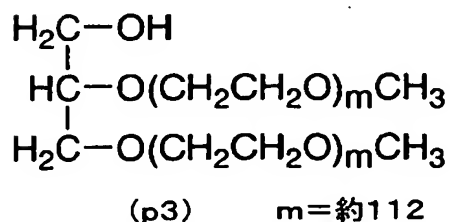
GPC分析; 数平均分子量(Mn): 10069      重量平均分子量(Mw): 10227

多分散度 (Mw/Mn) : 1.015

ピークトップ分子量 (Mp) : 10351

【0060】

【化20】



【0061】 (実施例2) メシレート体(群I (b)、Y=CH<sub>3</sub>)の合成 (R=メチル基、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O=オキシエチレン基、n=0、分子量約10000の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した200 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p3)を20 g (2mmol)、トルエン75 gを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン1.012 g (10mmol)、メタンスルホン酸クロリド0.687 g (6mmol)を加え、40℃にて6時間、更に50℃で1時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液をへ吸着剤「キョーワード1000」(協和化学工業株式会社製)を1.0 g加え、更に60℃で1時間攪拌し、副生成物のメタンスルホン酸のトリエチルアミン塩を吸着処理させた。反応液をろ過後、濾液を500 ml ビーカーへ仕込み、酢酸エチル100 ml、ヘキサン150 mlを加えて晶析を行った。析出した結晶を300 ml ビーカーへ濾取し、酢酸エチル100 mlを加えて40℃にて加温溶解後、ヘキサン100 mlを加えて再度晶析を行い析出した結晶を濾取、乾燥し、下記メシレート体(p4)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 内部標準TMS) δ (ppm): 3.08(3H, s, -SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)

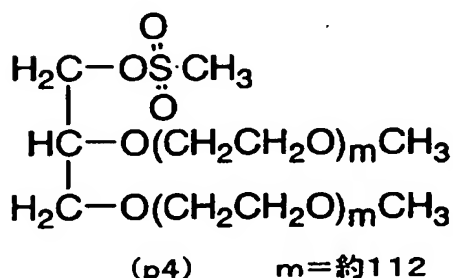
3.38(6H, s, -CH<sub>3</sub>) 3.40-3.80(897H, m, -CH<sub>2</sub>O (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub> CH<sub>3</sub>, CHO (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>) 4.27-4.44(2H, m, -CH<sub>2</sub>O SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 10054 重量平均分子量(Mw): 10214

多分散度(Mw/Mn): 1.015 ピークトップ分子量(M<sub>p</sub>): 10442

【0062】

【化21】



【0063】 (実施例3) アミノ体(群II (j))の合成 (R=メチル基、A

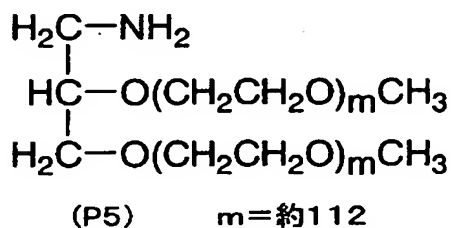
1 O、A<sup>2</sup>O=オキシエチレン基、n=0、分子量約10000の場合)

温度計、攪拌機、及び冷却管を付した100ml丸底フラスコへ上記メシレート体(p4)を1g(0.1mmol)、28%アンモニア水50mlを仕込み、50℃で36時間攪拌した。液温を65℃に上げ、2時間窒素を吹き込みながら、アンモニアを除去した。室温へ冷却後、食塩10gを加え、クロロホルム10mlにて抽出を3回行った。得られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、クロロホルムを留去した。得られた濃縮液にヘキサンを100ml加えて再沈殿を行い、析出した結晶を濾取、乾燥し、下記アミノ体(p5)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 内部標準H<sub>2</sub>O=4.7ppm)      δ (ppm): 3.38(6H, s, -CH<sub>3</sub>)  
2.93-3.11(2H, m, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)      3.40-3.80(897H, m, -  
CH<sub>2</sub>O (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, CHO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>)

【0064】

【化22】



【0065】 (実施例4) アルデヒド体(群I(f))の合成(R=メチル基、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O=オキシエチレン基、n=0、分子量約10000の場合  
(実施例4-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した200ml丸底フラスコへ上記メシレート体(p4)を10g(1mmol)、トルエン40mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去し、室温へ冷却した。一方、温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した100ml丸底フラスコへ、3,3-ジエトキシ-1-プロパノール14.8g(0.1mol)、トルエン40mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、金属ナトリウム0.36g(15.6mmol)を加え、室温で溶解するまで2時間攪拌した。金属ナトリウムの溶解を確認後、反応液を上記脱水を行った化合物(p4)の入った

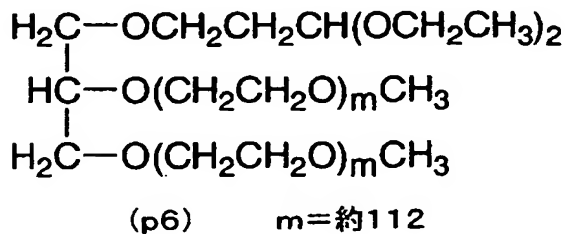
丸底フラスコへ投入し、110℃で12時間反応させた。反応液を40℃まで冷却後、イオン交換水0.36g(20mmol)を加えて30分攪拌後、20%食塩水50mlを加え、85%リン酸を用いて水層のpHを7.0に調整した。上層のトルエン層をとった後、水槽をクロロホルムにて2回抽出し、トルエン層とクロロホルム層をあわせて硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、トルエンとクロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液に酢酸エチル50mlを加えて加温溶解後、ヘキサン50mlを加えて結晶を析出させた。得られた結晶を濾取し、酢酸エチル50mlを加えて加温溶解後、ヘキサン50mlを加えて再度結晶を析出させた。この再沈殿操作を3回繰り返したあと、得られた結晶を濾取、乾燥し、下記アセタール体(p6)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 1.20(6H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ) 1.88-1.92(2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ) 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80(903H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$   $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$   $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ) 4.64(1H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ )

GPC分析; 数平均分子量( $M_n$ ): 9898 重量平均分子量( $M_w$ ): 10076  
多分散度( $M_w/M_n$ ): 1.018 ピークトップ分子量( $M_p$ ): 10215

【0066】

【化23】



【0067】 (実施例4-2)

得られたアセタール体(p6)の4gを200mlビーカーへはかりとり、イオン交換水80gを加えて結晶を溶解後、85%リン酸を用いてpHを1.5へ調整し、室温で2時間攪拌した。その後、食塩16gを加えて溶解させ、30%水酸化ナトリウム水溶液にてpHを7.0へ調整し、クロロホルム抽出を行った。得

られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、クロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液にトルエン 30 ml、酢酸エチル 30 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 60 ml を加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を 200 ml ビーカーへ計りとり、トルエン 30 ml、酢酸エチル 30 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 60 ml を加えて結晶を再度析出させ、濾取し、乾燥し、下記アルデヒド体 (p7) を得た。

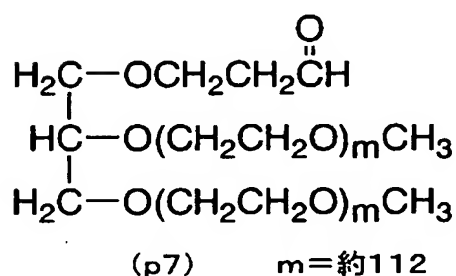
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 2.65(2H, m,  $\text{CH}_2\text{COH}$ )  
 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80(896H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m, \text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ ) 9.78(1H, m,  $\text{CH}_2\text{COH}$ )

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 10064 重量平均分子量(Mw): 10224

多分散度(Mw/Mn): 1.018 ピークトップ分子量(Mp): 10357

【0068】

【化24】



【0069】 (実施例5)

100 mMリン酸2水素ナトリウム溶液 50 ml 中へ、シアノトリヒドロほう酸ナトリウム 63 mg (20 mM) を加えて溶解させた。この溶液 1 ml へOVA (ALBUMIN, CHIKEN EGG 分子量約4万) 5.0 mg (0.1  $\mu\text{mol}$ )、アルデヒド体(p7) 100 mg を加え、室温で12時間攪拌した。反応液をイオン交換水にて5倍希釈し、この希釈液 20  $\mu\text{l}$  とトリスSDSサンプル処理液 20  $\mu\text{l}$  を混合後、沸騰水浴中で2分30秒加温した。この処理液をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (4-20%) 分析した。染色はCBB染色で行った。結果を図1に示す。(A) はOVA+アルデヒド体、(B) はOVAのみ、(C) はマーカー (Bio-rad Broad range SDS-PAGE standards) であり、上から分子量 2



01000, 130000, 94000, 48600, 36400, 29800, 20600, 6600 のバンドを示す。

これらの結果、(A)において、原料OVAのバンドは残存せず、OVA 1分子あたり1～15個所の化合物(p6)の修飾を受けた場合に相当する分子量のバンドが観察された。

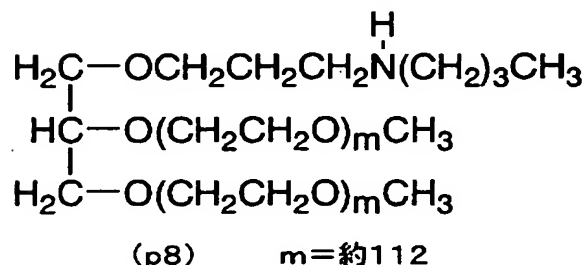
#### 【0070】 (実施例6)

本発明の化合物の安定性を評価するため、以下のモデル化合物を合成し、安定性の比較を行った。

(実施例6-1) シアノトリヒドロほう酸ナトリウム 63 mg (20 mM) をメタノール 50 ml へ溶解させた。この溶液 2 ml 中へ、アルデヒド体(p7) 0.5 g、n-ブチルアミン 50  $\mu$  l を加えて室温で18時間攪拌した。メタノールを留去、濃縮を行った後、濃縮液にクロロホルム 20 ml、20%食塩水 20 ml を加えて抽出を行い、この抽出操作を3回繰り返した。得られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、濃縮した。濃縮液に酢酸エチル 20 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 30 ml を加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を100 ml ビーカーへとり、酢酸エチル 20 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 20 ml を加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記化合物(p8)を得た。

#### 【0071】

##### 【化25】



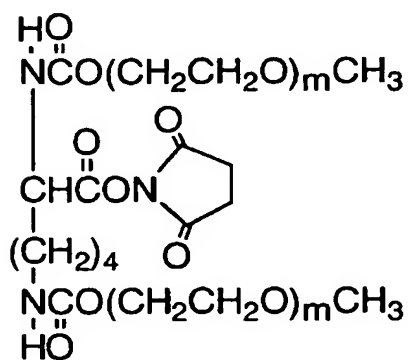
#### 【0072】 (実施例6-2)

Shearwater Polymers, Inc. より購入した分子量約10700の下記化合物(p9)を107 mg 計りとり、n-ブチルアミン 10  $\mu$  l とクロロホルム 1 ml を加

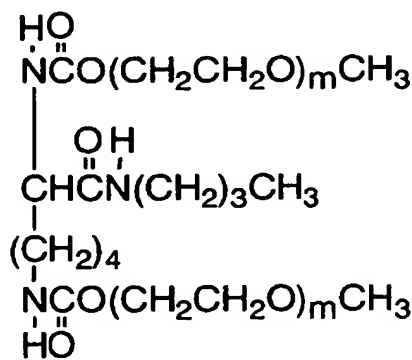
えて室温で18時間攪拌した。クロロホルムを留去、濃縮し、濃縮液に酢酸エチル20mlを加えて加温溶解後、ヘキサン30mlを加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を100mlビーカーへとり、酢酸エチル20mlを加えて加温溶解後、ヘキサン20mlを加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記化合物(p10)を得た。

【0073】

【化26】



(p9) m=約118



(p10) m=約118

【0074】 (実施例6-3) 安定性評価(加速劣化試験)

合成した上記化合物(p8)12mgを計りとり、リン酸緩衝液(pH=8.8)1mlを加えて、75℃水浴中にて12時間攪拌した。開始前と攪拌終了後、GPC測定を行った。結果を図2、3に示す。図2は化合物(p8)の開始前サンプルのGPCチャート、図3は(p8)の加温後サンプルのGPCチャートである。

【0075】 (比較例1)

合成した上記化合物(p10)を用い、実施例6-3と同じ操作を行い、GPC測定を行った。結果を図4、5に示す。図4は化合物(p10)の開始前サンプルのGPCチャート、図5は(p10)の加温後サンプルのGPCチャートである。図2、3の結果から、本発明の化合物は加水分解は起きず、高い安定性を示すことが示された。一方、図4、5の結果から、比較例の(p10)では1/2分子量が約25%生成しており、ウレタン結合が分解し、分岐型ポリエチレングリコールが一本鎖に分解していることが示された。

【0076】 (実施例7) 化合物 (p) の合成 (R = メチル基、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O = オキシエチレン基、n = 0、分子量約19000の場合)

(実施例7-1)

実施例1-3と同じ操作にて、エチレンオキシド2850g (64.8mol)を仕込み、下記化合物(p11)を得た。

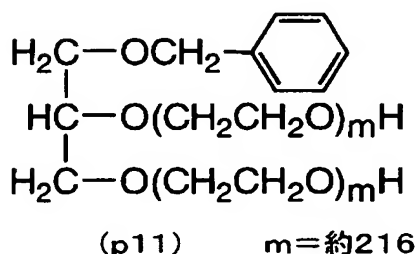
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 内部標準TMS) δ (ppm): 3.40-3.80 (1731H, m, -CH<sub>2</sub>O (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, CHO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>) 4.54 (2H, m, -CH<sub>2</sub>Ph) 7.27-7.38 (5H, m, -CH<sub>2</sub>Ph)

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 18521 重量平均分子量(Mw): 18758

多分散度(Mw/Mn): 1.012 ピークトップ分子量(M<sub>p</sub>): 19108

【0077】

【化27】



【0078】 (実施例7-2)

実施例1-4と同じ操作にて、(p11)を100g (5mmol)、トルエン320g、トリエチルアミン5.06g (50mmol)、メタンスルホン酸クロリド3.44g (30mmol)、ナトリウムメトキシド28%メタノール溶液9.65g (50mmol)を用いて、下記化合物(p12)を得た。

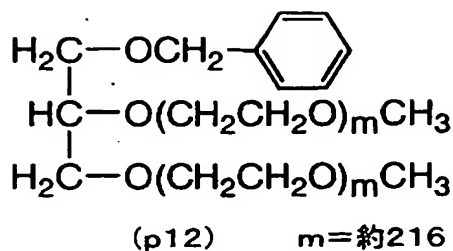
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 内部標準TMS) δ (ppm): 3.38 (6H, s, -CH<sub>3</sub>) 3.40-3.80 (1731H, m, -CH<sub>2</sub>O (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, CHO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>) 4.54 (2H, m, -CH<sub>2</sub>Ph) 7.27-7.38 (5H, m, -CH<sub>2</sub>Ph)

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 18365 重量平均分子量(Mw): 18602

多分散度(Mw/Mn): 1.012 ピークトップ分子量(M<sub>p</sub>): 18992

【0079】

## 【化 28】



## 【0080】 (実施例 7-3)

実施例 1-5 と同じ操作にて、下記化合物(p13)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ )

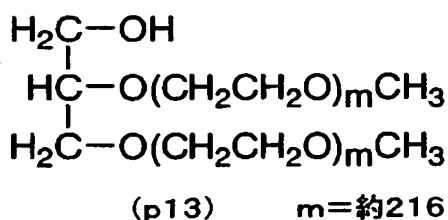
3.40-3.80(1731H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ )

GPC分析; 数平均分子量( $M_n$ ): 18395      重量平均分子量( $M_w$ ): 18632

多分散度( $M_w/M_n$ ): 1.013      ピークトップ分子量( $M_p$ ): 18989

## 【0081】

## 【化 29】



## 【0082】 (実施例 8)

カルボキシル体(群II(k))、及びコハク酸イミドエステル体(群I(a))の合成( $R$ =メチル基、 $A^1\text{O}$ 、 $A^2\text{O}$ =オキシエチレン基、 $n=0$ 、分子量約19000の場合)

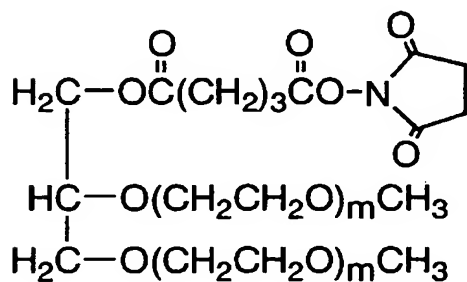
温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した200 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p13)を20 g (1.0mmol)、酢酸ナトリウム50 mg、トルエン100 ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。反応液へ無水グルタル酸137 mg (1.2mmol)を加え、105℃で12時間反応させた。反応終了後、反応液を40℃に冷却し、N-ヒドロキシコハク酸イミド150 m

g (1.3mmol)、ジシクロヘキシルカルボジイミド 289 mg (1.4mmol) を加え、そのまま 6 時間反応させた。反応液をろ過して析出したウレアを除去し、ろ液へ酢酸エチル 50 ml を加えた後、ヘキサン 150 ml を加えて結晶を析出させた。析出した結晶をろ取し、結晶を酢酸エチル 100 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 100 ml を加えて再度結晶化させた。析出した結晶をろ取、乾燥し、下記コハク酸イミドエステル体(p14)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 2.07(2H, m,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{C}$   
 $\text{H}_2\text{COON-}$ ) 2.50(2H, t,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$ ) 2.72(2H, t,  $-\text{COOCH}_2\text{CH}$   
 $2\text{CH}_2\text{COON-}$ ) 2.84(4H, s, succinimidyl) 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.  
 40-3.80(1731H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ) 4.10-4.3  
 0(2H, m,  $-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COON-}$ )

【0083】

【化30】



(p14)  $m \approx 216$

【0084】 (実施例9)

p-ニトロフェニルカーボネート体(群I (d))の合成(R=メチル基、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O=オキシエチレン基、n=0、分子量約19000の場合

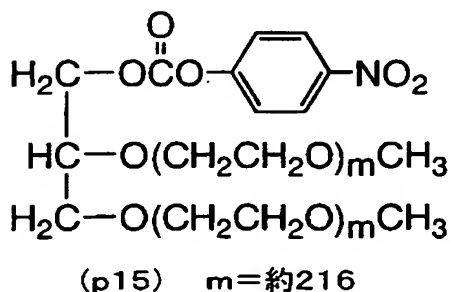
温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した200 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p13)を20 g (1.0mmol)、トルエン100 ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。反応液を80℃に降温し、トリエチルアミン、p-ニトロフェニルクロロホルメートを加え、80℃で5時間反応させた。反応終了後、反応液をろ過し、ろ液へ酢酸エチル100 ml を加えた後、ヘキサン200 ml を加えて結晶を析出させた。析出した結晶をろ取し、結晶

を酢酸エチル 100 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 100 ml を加えて再度結晶化させた。この晶析操作を合計 5 回繰り返した。ろ取した結晶を乾燥し、下記 p-ニトロフェニルカーボネート体(p15)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ )  
 3.40-3.80(1731H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ) 4.30-4.50(2H, m,  $-\text{CH}_2\text{OCOOPhNO}_2$ ) 7.39(2H, d,  $-\text{Ph NO}_2$ ) 8.28 (2H, d,  $-\text{Ph NO}_2$ )

【0085】

【化31】



【0086】 (実施例10)

化合物 (p) の合成 ( $R = \text{メチル基}$ 、 $A^1\text{O}$ 、 $A^2\text{O} = \text{オキシエチレン基}$ 、 $n = \text{約} 30$ 、分子量約 19500 の場合)

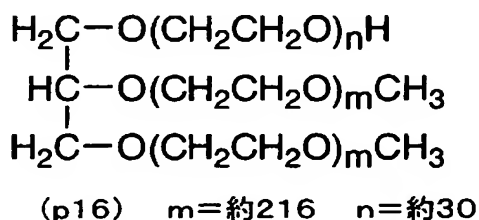
温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した 500 ml 丸底フラスコへ実施例 7-3 で得られた化合物(p13)を 67 g (3.5mmol)、トルエン 400 ml を仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。反応液を 40℃に降温し、ナトリウムメトキシド 28%メタノール溶液 0.41 g (2.1mmol) を加え、70℃に昇温し、窒素バブリングを行いながらトルエン-メタノール混合液約 200 ml を留去した。この溶液を 5L オートクレーブへ仕込み、系内を窒素置換後、100℃に昇温し、100～150℃、1 MPa 以下の圧力でエチレンオキシド 9.2 g (0.2mol) を加えた後、更に 3 時間反応を続けた。減圧にて未反応のエチレンオキサイドガス、及びトルエンを除去後、60℃に冷却して 5%リン酸水溶液にて pH を 7.5 に調整し、下記化合物(p16)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ )  
 3.40-3.80(1853H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$   $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ )

GPC分析; 数平均分子量(Mn): 19153 重量平均分子量(Mw): 19462  
 多分散度(Mw/Mn): 1.016 ピークトップ分子量( $M_p$ ): 19612

【0087】

【化32】



【0088】 (実施例11)

メシレート体(群I (b)、 $\text{Y}=\text{CH}_3$ )の合成 ( $\text{R}=\text{メチル基}$ ,  $\text{A}^1\text{O}$ ,  $\text{A}^2\text{O}=\text{オキシエチレン基}$ ,  $n \approx 30$ , 分子量約19500の場合)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した200 ml 丸底フラスコへ上記化合物(p16)を10 g (0.5mmol)、トルエン75 gを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、トリエチルアミン0.253 g (2.5mmol)、メタンスルホン酸クロリド0.172 g (1.5mmol)を加え、40℃にて6時間、更に50℃で1時間反応させた。反応液をろ過後、ろ液へ吸着剤「キョーワード1000」を0.5 g加え、60℃で1時間攪拌し、副生成物のメタンスルホン酸のトリエチルアミン塩を吸着処理させた。反応液をろ過後、濾液を300 ml ビーカーへ仕込み、酢酸エチル50 ml、ヘキサン70 mlを加えて晶析を行った。析出した結晶を300 ml ビーカーへ濾取し、酢酸エチル50 mlを加えて40℃にて加温溶解後、ヘキサン50 mlを加えて再度晶析を行い、析出した結晶を濾取、乾燥し、下記メシレート体(p17)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.08(3H, s,  $-\text{SO}_3\text{CH}_3$ )  
 3.38(6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80(1851H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}$

$O(CH_2CH_2O)_mCH_3 -CH_2O(CH_2CH_2O)_nSOOCH_3$  4.37-4.39(2H, m,  $-CH_2$

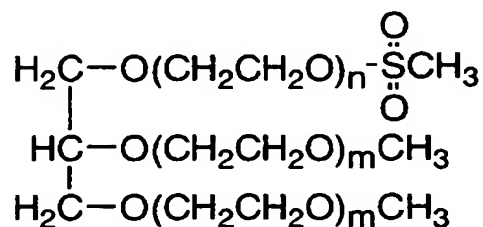
$O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2O SOOCH_3$ )

G P C 分析; 数平均分子量(Mn): 19253 重量平均分子量(Mw): 19601

多分散度(Mw/Mn): 1.020 ピークトップ分子量(Mp): 19770

【0089】

【化33】



(p17) m=約216 n=約30

【0090】 (実施例12)

アルデヒド体(群I(f))の合成(R=メチル基、A<sup>1</sup>O、A<sup>2</sup>O=オキシエチレン基、n=30、分子量約19500の場合

(実施例12-1)

温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した200ml丸底フラスコへ上記メシレート体(p17)を10g(0.5mmol)、トルエン40mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去し、室温へ冷却した。一方、温度計、窒素吹き込み管、攪拌機、Dean-stark管、及び冷却管を付した100ml丸底フラスコへ、3,3-ジエトキシー1-プロパノール7.4g(50mmol)、トルエン40mlを仕込み、加熱還流させ、水分を共沸除去した。室温へ冷却後、金属ナトリウム0.17g(7.4mmol)を加え、室温で溶解するまで2時間攪拌した。金属ナトリウムの溶解を確認後、反応液を上記脱水を行った化合物(p17)の入った丸底フラスコへ投入し、70℃で4時間反応させた。反応液を40℃まで冷却後、イオン交換水0.18g(10mmol)を加えて30分攪拌後、20%食塩水30mlを加え、85%リン酸を用いて水層のpHを7.0に調整した。上層のトルエン層をとった後、水槽をクロロホルムにて2回抽出し、トルエン層とクロロホルム層をあわせて硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、トルエンとクロロホルムを



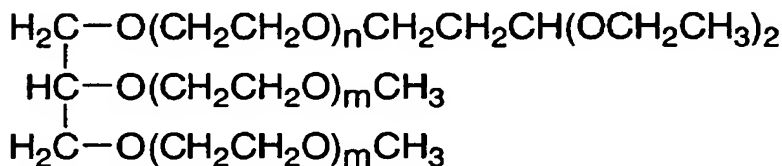
留去し、濃縮を行った。濃縮液に酢酸エチル 50 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 50 ml を加えて結晶を析出させた。得られた結晶を濾取し、酢酸エチル 50 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 50 ml を加えて再度結晶を析出させた。この再沈殿操作を 3 回繰り返したあと、得られた結晶を濾取、乾燥し、下記アセタール体 (p18) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準 TMS)  $\delta$  (ppm): 1.20 (6H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ) 1.88-1.92 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ) 3.38 (6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80 (1857H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$   $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ ) 4.64 (1H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$ )

GPC 分析; 数平均分子量 (Mn): 19318 重量平均分子量 (Mw): 19699  
多分散度 (Mw/Mn): 1.022 ピークトップ分子量 (Mp): 19770

【0091】

【化 34】



(p18)  $m \approx 216$   $n \approx 30$

【0092】 (実施例 12-2)

得られたアセタール体 (p18) の 2 g を 100 ml ビーカーへはかりとり、イオン交換水 40 g を加えて結晶を溶解後、85%リン酸を用いて pH を 1.5 へ調整し、室温で 2 時間攪拌した。その後、食塩 8 g を加えて溶解させ、30%水酸化ナトリウム水溶液にて pH を 7.0 へ調整し、クロロホルム抽出を 3 回行った。得られたクロロホルム層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過後、クロロホルムを留去し、濃縮を行った。濃縮液にトルエン 30 ml、酢酸エチル 30 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 60 ml を加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を 200 ml ビーカーへ計りとり、トルエン 30 ml、酢酸エチル 30 ml

1 を加えて加温溶解後、ヘキサン 6 0 m l を加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記アルデヒド体 (p 1 9) を得た。

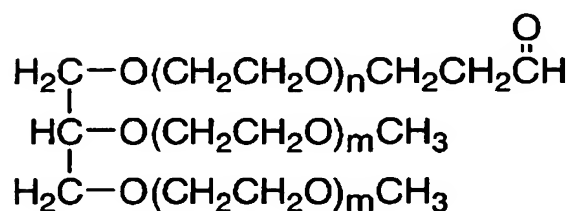
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 2.66-2.69 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{COH}$ )  
 3.38 (6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80 (1853H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$   $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$  9.79 (1H, t,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COH}$ )

G P C 分析; 数平均分子量 (Mn): 17335 重量平均分子量 (Mw): 19475

多分散度 (Mw/Mn): 1.123 ピークトップ分子量: 2 2 0 3 7

【0 0 9 3】

【化 3 5】



(p19)  $m \approx 216$   $n \approx 30$

【0 0 9 4】 (実施例 1 3)

メシレート体(群 I (b)、 $\text{Y}=\text{CH}_3$ )の合成 ( $\text{R}=\text{メチル基}$ 、 $\text{A}^1\text{O}$ 、 $\text{A}^2\text{O}=\text{オキシエチレン基}$ 、 $n=0$ 、分子量約 1 9 0 0 0 の場合)

化合物 (p 1 3) を原料とし、実施例 2 と同様の方法にて、下記メシレート体 (p 2 0) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準TMS)  $\delta$  (ppm): 3.08 (3H, s,  $-\text{SO}_3\text{CH}_3$ )  
 3.38 (6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80 (1729H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ) 4.27-4.44 (2H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}\text{SO}_3\text{CH}_3$ )

G P C 分析; 数平均分子量 (Mn): 18435 重量平均分子量 (Mw): 18682

多分散度 (Mw/Mn): 1.013 ピークトップ分子量: 1 8 7 4 0

【0 0 9 5】



ルアミン 73  $\mu$  l を仕込み、45℃にて加温溶解させた。この溶液へ N-Succinimidyl 3-maleimidopropionate 0.14 g (0.525 mmol) を加え、45℃で4時間反応させた。反応終了後、吸着剤「キョーワード 700」を 0.5 g、「キョーワード 1000」0.5 g を加え、45℃で更に1時間攪拌した。反応液をろ過し、濾液にヘキサン 50 ml を加えて結晶を析出させ、濾取した。得られた結晶を 200 ml ビーカーへ計りとり、酢酸エチル 50 ml を加えて加温溶解後、ヘキサン 50 ml を加えて結晶を再度析出させ、濾取、乾燥し、下記マレイミド体 (p 22) を得た。

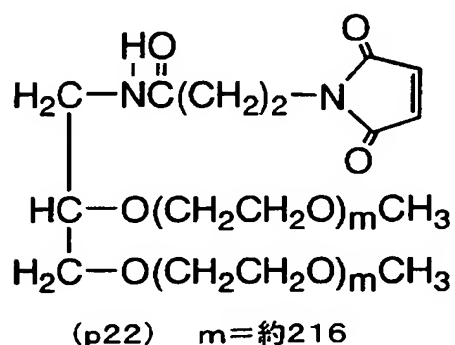
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 内部標準 TMS)  $\delta$  (ppm): 2.51 (2H, t,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ )  
 3.38 (6H, s,  $-\text{CH}_3$ ) 3.40-3.80 (1733H, m,  $-\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ ,  
 $\text{CHO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$   $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ) 6.69 (2H, s,  $\text{CH}=\text{CH}$ )  
 6.86 (1H, t,  $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ )

GPC 分析; 数平均分子量 ( $M_n$ ): 18425 重量平均分子量 ( $M_w$ ): 18672

多分散度 ( $M_w/M_n$ ): 1.013 ピークトップ分子量 ( $M_p$ ): 18742

【0099】

【化38】



【図面の簡単な説明】

【図1】 OVA と、修飾された OVA のポリアクリルアミドゲル電気泳動法による実験結果を示す。

【図2】 化合物 p-8 の加速劣化試験前の GPC 測定の結果を示すチャートである。

【図 3】 化合物 p - 8 の加速劣化試験後の G P C 測定の結果を示すチャートである。

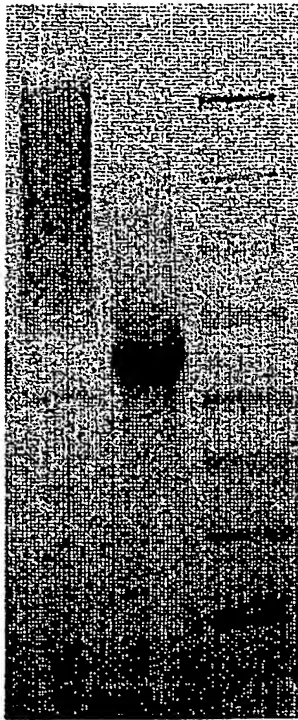
【図 4】 化合物 p - 1 0 の加速劣化試験前の G P C 測定の結果を示すチャートである。

【図 5】 化合物 p - 1 0 の加速劣化試験後の G P C 測定の結果を示すチャートである。

【書類名】

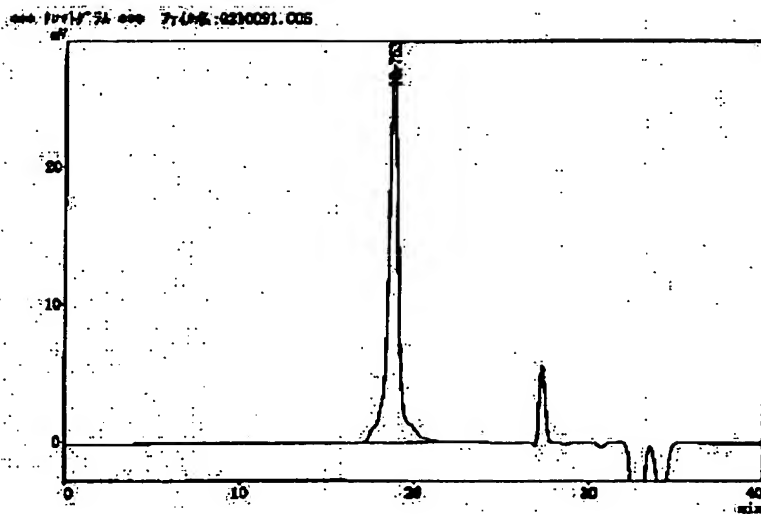
図面

【図 1】

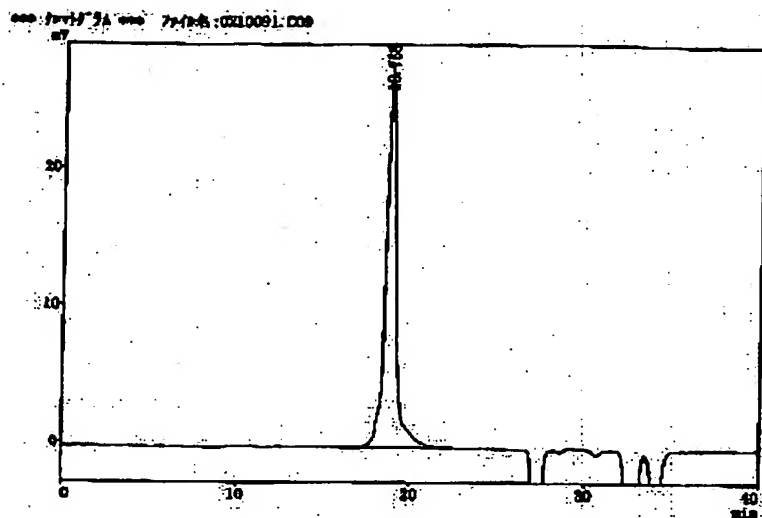


(A) (B) (C)

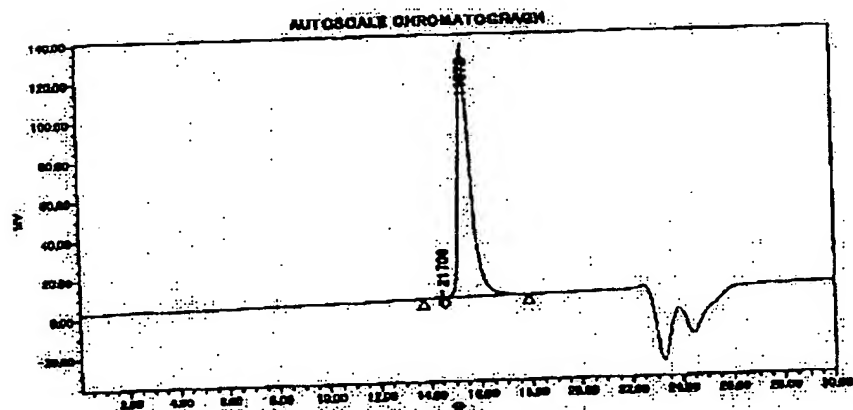
【図 2】



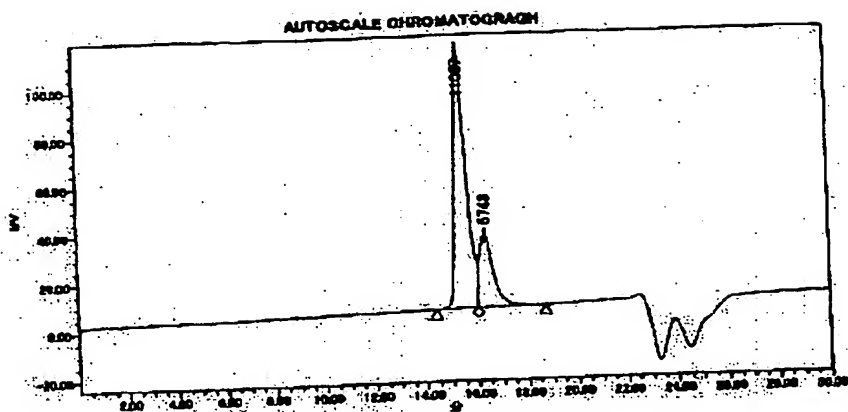
【図 3】



【図 4】



【図 5】



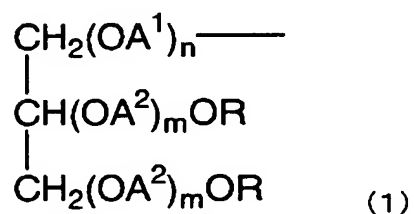


【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 分子中に少なくとも 1 個の式 (1) で表されるポリアルキレングリコールオキシ基を結合してなる、修飾された生体関連物質 (R は炭素数 1 ～ 24 の炭化水素基であり、OA<sup>1</sup>、OA<sup>2</sup> は炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、R、OA<sup>2</sup> は一分子中で互いに同一または異なる。n および m はオキシアルキレン基の平均付加モル数であり、n は 0 ～ 1000、m は 10 ～ 1000 を示す)

【化 1】



【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 3 7 1 1 3

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 3 4 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 1 1 月 9 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 3 号

氏 名

日本油脂株式会社